

Ifew

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Volker JÄGER and Marc BARTHOLD

Appln. No.: 10/816,113

Filed: April 1, 2004

For: BIOREACTOR FOR CULTIVATING CELLS ON A MATRIX

Attorney Docket No.: 4054.001

Customer Number: 000041288

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

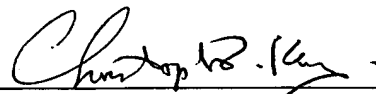
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Attached please find the following:

1. Copy of the Priority Document, German Application No.  
PCT/DE03/01255, filed May 16, 2003.

Respectfully submitted,

  
\_\_\_\_\_  
Christopher J. Kay  
Registration No. 44,820

PENDORF & CUTLIFF  
P. O. Box 20445  
Tampa, Florida 33622-0445  
(813) 886-6085

Date: June 9, 2004

U.S. Application No.: 10/816,113

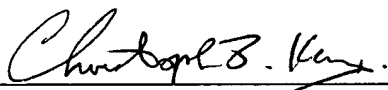
Submission of Certified Copy of Priority Document

Attorney Docket No. 4054.001

**CERTIFICATE OF MAILING AND AUTHORIZATION TO CHARGE**

I hereby certify that the foregoing SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT for U.S. Application No. 10/816,113, filed April 1, 2004, was deposited in first class U.S. mail, postage prepaid, addressed: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on this 9th day of June 2004.

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required at any time during the prosecution of this application without specific authorization, except for the Issue Fee, or credit any overpayment, to Deposit Account No. 16-0877.

  
\_\_\_\_\_  
Christopher J. Kay



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer internationalen Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** PCT/DE 03/01255

**Internationaler  
Anmeldetag:** 16. Mai 2003

**Anmelder/Inhaber:** meredos GmbH, 37120 Bovenden/DE

**Bezeichnung:** Biotechnologisches Reaktionssystem zur Kultivierung  
von adhärenenten Zellkulturen oder Geweben kleiner  
Volumina

**IPC:** noch nicht festgelegt

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser internationalen Patentanmeldung.

München, den 25. Mai 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wallner

**PCT/DE 03/01255**  
**DEUTSCHES PATENT- UND MARKENAMT**

An das  
**Deutsche Patent- und Markenamt**  
 80297 München

In der Anschrift Straße, Haus-Nr. und ggf. Postfach angeben	(1) <b>Sendungen des Deutschen Patent- und Markenamts sind zu richten an:</b>		<b>Einleitung der nationalen Phase          einer PCT-Anmeldung für die          Erteilung eines Patents</b>	
	<b>Zenneck, Claus</b> <b>Alte Dorfstr. 37</b> <b>D-37120 Bovenden</b>		Aktenzeichen <b>PCT/</b> ..... / .....	
	<input checked="" type="checkbox"/> <b>TELEFAX</b> vorab am 2003-04-03 <small>Aktenzeichen (wird vom Deutschen Patent- und Markenamt vergeben)</small>		<small>s. auch Rückseite</small>	
nur auszu- füllen, wenn abweichend von Feld (1)	(2) <b>Zeichen des Anmelders/Vertreters (max. 20 Stellen)</b>	<b>Telefon des Anmelders/Vertreters</b> +49(0)551/50835-79	<b>Datum</b> 2003-04-03	
	(3) <b>Der Empfänger in Feld (1) ist der</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Anmelder</b> <input type="checkbox"/> <b>Zustellungsbevollmächtigte</b> <input type="checkbox"/> <b>Vertreter</b> ggf. Nr. der Allgemeinen Vollmacht			
	<b>Anmelder</b> meredos GmbH Alte Dorfstr. 37 D-37120 Bovenden  <b>Vertreter</b> <i>das soll PCT-Antrag sein. Dr. H. Zenneck</i>			
soweit bekannt	(5) <b>Anmeldercode-Nr.</b>	<b>Vertretarcode-Nr.</b>	<b>Zustelladresscode-Nr.</b>	<b>ABT</b> ..... <b>ERF</b> .....
	(6) <b>Bezeichnung der Erfindung</b> (bei Überlänge auf gesondertem Blatt - 2fach) Biotechnologisches Reaktionssystem zur Kultivierung von adhärenen Zellkulturen oder Geweben kleiner Volumina			
	(7) <input type="checkbox"/> <b>Antrag auf vorzeitige Bearbeitung oder Prüfung gemäß Artikel 23 (2) PCT bzw. Artikel 40 (2) PCT</b> <input type="checkbox"/> <b>DE ist noch als nationale Bestimmung benannt</b> Anmeldetag: ..... Priorität: .....			
Erörterung und Kosten- hinweise s. Rückseite	(8) <b>Sonstige Anträge</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Prüfungsantrag (§ 44 Patentgesetz)</b>			
	(9) <b>Gebührenzahlung in Höhe von</b> <u>410</u> <b>EUR</b> <input type="checkbox"/> <b>Einzugsermächtigung</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Überweisung (nach Erhalt der Empfangsbescheinigung)</b> <input type="checkbox"/> <b>Abbuchung von meinem/unserem Abbuchungskonto bei der Dresdner Bank AG, München</b> <small>Vordruck (A 9507) ist beigelegt</small> <small>Abbuchungsauftrag (V 1244) ist beigelegt</small>			
	(10) <b>Anlagen</b> Anlagen 3. - 7. jeweils 3-fach 1. <u>    </u> <b>Vertretervollmacht</b> 2. <u>    </u> <b>Erfinderbenennung</b> 3. <u>1</u> <b>Zusammenfassung</b> (ggf. mit Zeichnung Flg. <u>    </u> ) 4. <u>3</u> <b>Seite(n) Beschreibung</b> (ggf. mit Bezugszeichenliste) 5. <u>1</u> <b>Seite(n) Patentansprüche</b> 6. <u>1</u> <b>Anzahl Patentansprüche</b> 7. <u>1</u> <b>Blatt Zeichnungen</b> 8. <u>11</u> <b>Abschrift(en) d. Voranmeld.</b> 9. <u>11</u> <b>Zitierte Nichtpatentliteratur</b>			

*C. Zenneck*  
**C. Zenneck**  
 (11) Unterschrift(en)

**Nur vom Deutschen Patent- und Markenamt auszufüllen:**

Die Unterlagen sind an dem durch Perforierung angegebenen Tag beim Deutschen Patent- und Markenamt eingegangen.  
 Das o.a. Aktenzeichen des Deutschen Patent- und Markenamts ist bei allen Eingaben anzugeben. Bei Zahlungen ist das vollständige Aktenzeichen und der Verwendungszweck in Form des Gebührencodes (s. Rückseite zu Feld (9)) zu vermerken.

- ☐ Bei Abbuchung bzw. Einzugsermächtigung: V 1244, A 9507 bzw. Doppel an Zahlstelle gesandt.  
☐ Die genannten Anlagen sind vollständig eingegangen.  
☐ Folgende o.a. Anlagen fehlen:

Bitte beachten Sie die Hinweise  
 auf der Rückseite  
 der zurückgehaltenen Antragsdurchschrift

P 2009  
 1.02

Über Fernkopierer eingegangen  
 Seite(n)-Deutsches Patent-  
 und Markenamt

**Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN**

Bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden.

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen:

**Regionales Patent**

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mosambik, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZM Sambia, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidtschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH & LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden, TR Türkei und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GQ Äquatorialguinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....

**Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):**

- |  |   |  |
|--|---|--|
| <input type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate   | <input type="checkbox"/> GM Gambia  | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland                     |
| <input type="checkbox"/> AG Antigua und Barbuda            | <input type="checkbox"/> HR Kroatien  | <input type="checkbox"/> OM Oman                           |
| <input type="checkbox"/> AL Albanien                       | <input type="checkbox"/> HU Ungarn  | <input type="checkbox"/> PH Philippinen                    |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien                       | <input type="checkbox"/> ID Indonesien                                      | <input type="checkbox"/> PL Polen                          |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich                     | <input type="checkbox"/> IL Israel  | <input type="checkbox"/> PT Portugal                       |
| <input type="checkbox"/> AU Australien                     | <input type="checkbox"/> IN Indien  | <input type="checkbox"/> RO Rumänien                       |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidtschan                 | <input type="checkbox"/> IS Island  | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation           |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegovina            | <input type="checkbox"/> JP Japan   |  |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados                       | <input type="checkbox"/> KE Kenia   | <input type="checkbox"/> SD Sudan                          |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien                      | <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan                                     | <input type="checkbox"/> SE Schweden                       |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien                      | <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea               | <input type="checkbox"/> SG Singapur                       |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus                        | <input type="checkbox"/> KR Republik Korea                                  | <input type="checkbox"/> SI Slowenien                      |
| <input type="checkbox"/> BZ Belize                         | <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan                                      | <input type="checkbox"/> SK Slowakei                       |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada                         | <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia                                     | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone                   |
| <input type="checkbox"/> CH & LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                                       | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan                  |
| <input type="checkbox"/> CN China                          | <input type="checkbox"/> LR Liberia   | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan                   |
| <input type="checkbox"/> CO Kolumbien                      | <input type="checkbox"/> LS Lesotho   | <input type="checkbox"/> TN Tunesien                       |
| <input type="checkbox"/> CR Costa Rica                     | <input type="checkbox"/> LT Litauen   | <input type="checkbox"/> TR Türkei                         |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba                           | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg                                       | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago            |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik          | <input type="checkbox"/> LV Lettland  |  |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland                    | <input type="checkbox"/> MA Marokko   | <input type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania   |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark                       | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau                                 | <input type="checkbox"/> UA Ukraine                        |
| <input type="checkbox"/> DM Dominica                       |   | <input type="checkbox"/> UG Uganda                         |
| <input type="checkbox"/> DZ Algerien                       | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar                                      | <input type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> EC Ecuador                        | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |  |
| <input type="checkbox"/> EE Estland                        | <input type="checkbox"/> MN Mongolei  | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan                     |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien                        | <input type="checkbox"/> MW Malawi  | <input type="checkbox"/> VN Vietnam                        |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland                       | <input type="checkbox"/> MX Mexiko  | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien                    |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich         | <input type="checkbox"/> MZ Mosambik  | <input type="checkbox"/> ZA Südafrika                      |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada                        | <input type="checkbox"/> NO Norwegen  | <input type="checkbox"/> ZM Sambia                         |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien                       |   | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe                       |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana                          |   |  |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind.

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen:** Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)



### 1. Bezeichnung der Erfindung

Biotechnologisches Reaktionssystem zur Kultivierung von adhärennten Zellkulturen oder Geweben kleiner Volumina

### 2. Einleitung

Die Erfindung bezieht sich auf ein biotechnologisches Reaktionssystem zur Kultivierung von adhärennten Zellkulturen oder Geweben, in einem zylindrischen konischen oder frei geformten mehrteiligen Halter für massive, poröse oder partikuläre Trägermaterialien mit variabler Formgebung und der Möglichkeit der gleichmäßigen regelbaren Durchströmung mit Kulturmedium zur Versorgung der Zellen. Sowie der geregelten Begasung und geregelten kontinuierlichen Perfusion.

### 3. Stand der Technik

Im Bereich des Tissue-Engineering wurden verschiedenste Techniken ausprobiert um eine Medien-Perfusion von dreidimensionalen Gerüsten (Scaffold) zu erreichen. Der uneffektivste Weg hohe Zelldichten auf dem Gerüstmaterial zu erreichen ist die Kultivierung in statischer Kultur (Ishaug-Riley, 1998). Unterschiedlichste Versuche zur Erhöhung der Besiedlungsdichte in größere Tiefen des Materials 200-300 µm wurden gemacht. Goldstein et al. (1999) versuchten die Kultivierung der Gerüste in Roller-Flaschen, Shea et al. (2000) untersuchten die Kultivierung von PLGA-Schaum in Spinner-Flaschen. Beide erreichten nur geringfügig bessere Resultate gegenüber der statische Kultivierung. Außerdem birgt die Kultivierung spröden Materials in einer bewegten Kultur die Gefahr der Beschädigung der Gerüstmaterialien.

Deshalb erscheint ein fixiertes Gerüst in bewegtem Medium als die bessere Alternative. Dies wurde realisiert in einer dynamischen Kultur (Davies et al. 1999). Das Material ist fixiert in einem 50 ml Röhrengefäß, gefüllt mit 40 ml Kultur-Medium. Das Gefäß ist fixiert auf einer exzentrisch rotierenden Scheibe, mit der Befestigungsmöglichkeit für max. 8 konische Gefäße. Die Autoren beschreiben eine deutlich bessere Besiedlung in den tieferen Regionen der Gerüste als in normalen bewegten Kulturen. Überdies gelang so die Kultivierung auf spröden Calciumphosphate Gerüsten über 8 Wochen ohne Beschädigung. Dies System ist einfach und leicht zu handhaben, erlaubt aber keine kontrollierte Begasung und keinen kontinuierlichen Medienaustausch. Ferner ist keine Prozesskontrolle ohne Unterbrechung der Kultivierung möglich.

Auf dem Markt befinden sich derzeit zwei Kammer-Systeme, produziert von Minuth-Tissue (DE0003923279C2 ; US 0005665599A) und Cell-Lining. Diese kleinen Perfusionskammern erlauben einen kontinuierlichen Medienfluß durch die Kammer und ermöglichen die Kultivierung von adhärennten Zellen auf einer Membran, die beidseitig vom Medium angeströmt werden kann. Die Gehäuse sind groß genug um auch dreidimensionale Gerüste aufzunehmen, sie erlauben aber nicht die Fixierung der Gerüste in der Form, das das Medium ausschließlich durch die Poren der Gerüste strömt. Trotzdem erscheinen diese Systeme geeignet für di

zweidimensionale Kultivierung von Epithel und Nierenzellen (Minuth et al. 2001, Schuhmacher et al. 2002) und die dreidimensionale Kultivierung von Knorpel (Sittinger et al. 1994) der Mangel der erzwungenen Perfusion von Gerüsten reduziert die Chance für eine erfolgreiche Kultivierung dreidimensionaler Kulturen mit höherem Sauerstoffbedarf.

Ein weiteres System mit drei parallel liegenden Kammern für die Perfusion dreidimensionaler Gerüste durch hydrostatischen Druck wurde von Goldstein et al. (2001) vorgestellt.

Die Erfindung ist eingebettet in ein volumenoptimiertes Kultivierungssystem bestehend aus zylindrischem Außen- und konischem Innengefäß, mit Deckel zum Einbringen und Anordnen von Anschlußstutzen, Meßsonden etc. sowie Einrichtungen zum gas- und flüssigkeitsdichten sowie sterildichten Verbinden von Außengefäß, Kultivierungsgefäß, Deckel und Einbauten. Ein ähnliches Reaktionssystem mit konischem Innengefäß ist in DE 19710650 A1 beschrieben. Insbesondere der Deckel, der in der Regel aus einer Metall- oder Kunststoffscheibe besteht, wird mit einer Vielzahl von Anschlußstutzen, Meßsonden etc. versehen, die unterschiedlichste Aufgaben zu erfüllen haben. Diese Auf- oder auch Einbauten sind je nach Anwendungsfall in kleinerer oder größerer Anzahl erforderlich, wobei der Deckel relativ dicht bestückt wird. Eine Mindestanzahl von Ein- bzw. Aufbauten hat einen Mindestdeckeldurchmesser zur Folge. Durch die konische Ausformung ist eine Arbeitsvolumenreduzierung vorgegeben. Durch geeignete Einbauten, Sonden und periphere Pumpen wird eine Konditionierung des Mediums (pH, pO<sub>2</sub>, Temp, Mischung) sowie ein Perfusionsbetrieb ermöglicht.

#### 4. Biotechnologisches Reaktionssystem

Der Erfindung liegen zwei Überlegungen zugrunde. Zum einen das Reaktionssystem der eingangs beschriebenen Art so auszubilden, daß bei einer Mindestanzahl von Ein- und Aufbauten ein möglichst kleines Reaktions- bzw. Kultivierungsvolumen entsteht wobei das Füllvolumen in einem weiten Bereich variiert werden kann und zum anderen hieraus ein modulares Reaktionssystem zu schaffen, daß es ermöglicht, unterschiedlichste Trägermaterialien mit unterschiedlichster Formgebung kontrolliert mit Kulturmedium zu um- und durchströmen, um eine optimale Versorgung der Zellen zu gewährleisten. Zum anderen durch Austausch weniger Bauteile eine Anpassung an unterschiedlichste Verfahren und Trägermaterialien zu erreichen.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß das Reaktionssystem eine zylindrische-, konische Außenform oder eine Kombination aus Beidem besitzt, der Innenraum kann in Größe und Form den vorgesehenen Materialien angepaßt werden. Durch einen vor und hinter der Kammer gelegenen Konus mit Bohrung ist eine gleichmäßige Durch- und Umströmung der eingebrachten Materialien gewährleistet. Durch ein englumiges in der Höhe verstellbares Rohr kann die Eintauchtiefe in das umspülende Kulturmedium eingestellt werden. Durch eine Pumpe wird das Medium im Kreislauf geführt. Durch Regelung der Pumpe kann die Durchströmungsgeschwindigkeit variiert werden.

Das konische Innengefäß hat im unteren Bereich eine zylindrische Anformung mit Flachboden zur Aufnahme eines magnetgekuppelten Rührelements mit Propeller zur Durchmischung und Gasversorgung, das so ausgeführt ist, das durch ein Maximum von Verdrängung ein Minimum an zirkulierendem Medium erreicht wird.

## 5. Applikationsbeispiel

Das Bio-Reaktor-System ist einsetzbar für die Erzeugung von *in vitro* Knochen Implantaten. Für diesen Zweck werden Zellen mit dem Potential der Bildung einer extrazellulären Matrix und späteren Mineralisation dreidimensional auf geeignetem biokompatiblen und bioresorbierbarem Gerüst-Material kultiviert. Aus dem Femur 5 Wochen alter weiblicher Ratten werden osteogene Zellen isoliert und auf macroporösen mit interkonnektiven Poren versehenen Beta-Tricalcium-Phosphat-Gerüst-Strukturen (Scaffold) angesiedelt. Jedes Scaffold mit einem Totalvolumen von  $1 \text{ cm}^3$  wird mit 10 Millionen Zellen beimpft und für 12 Stunden inkubiert, um den Zellen die Anheftung an das Material zu ermöglichen, bevor es in den Bio-Reaktor eingebracht wird.

Für die Langzeitkultivierung osteogener Zellen über mehr als 7 Tage ist ein kontinuierlicher Medienaustausch einem Batchweisen Austausch vorzuziehen. Trotz des sehr viel komplexeren Bio-Reaktor-Aufbaus verringert sich dadurch der Aufwand an Arbeiten während der Kultivierung und damit die Gefahr der Kontamination. Außerdem gewährleistet dieses Verfahren eine gleichmäßige Kultivierung und entspricht am ehesten der Situation *in vivo*.

Über den gesamten Kultivierungszeitraum wurden zwei unterschiedliche Medien eingesetzt. Während der ersten 7 Tage wurde ein Proliferationsmedium für den Medien-Austausch eingesetzt. Ab des 7. Tages bis zum Ende der Kultivierung wurde ein Differenzierungsmedium zum Austausch verwendet. Mit diesem Medium wurden die die Proliferation unterstützenden, die Differenzierung jedoch verringernden Cytokine kontinuierlich entfernt um das Zellwachstum zu verringern und die Zell-Differenzierung zu erhöhen. Pro Tag wurde 10 ml Medium ausgetauscht.

Für die Untersuchung der Zell-Proliferation und Differenzierung unter diesen Kulturbedingungen wurden mehrere Parameter ( Fig. 2 und 3.) überwacht. Die L-Lactat-Produktion zeigt die metabolische Gesamtaktivität der Zellen, lösliche alkalische Phosphatase und Osteocalcin repräsentieren vorherrschende Marker für osteogene Differenzierung, freigesetzte Lactat-Dehydrogenase weist auf tote Zellen hin. Die Gesamtanzahl an Zellen wurde durch DNA-Fluoreszenzfärbung mit Hoechst 33258 gemessen. Diese invasive Methode erfordert die komplette Homogenisierung der Zellen und des Gerüstmaterials.



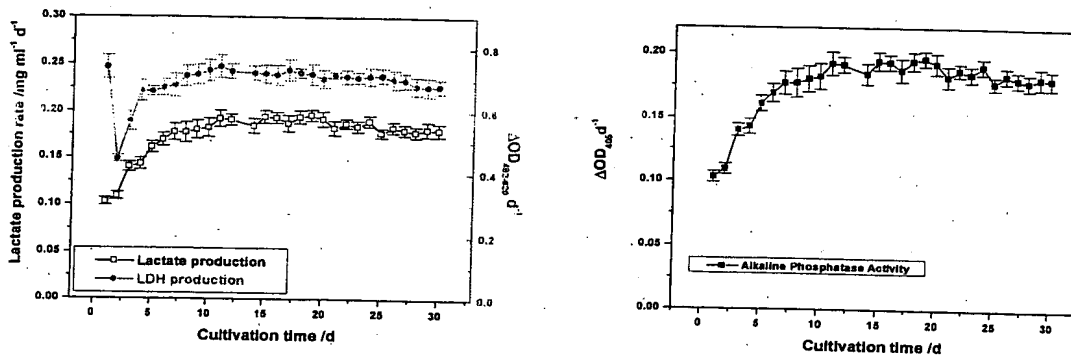


Fig. 1: L-lactat Produktionsrate, freigesetzte Lactat-Dehydrogenase, und alkalische Phosphatase Produktionsrate bei Kultivierung im Bio-Reaktor mit kontinuierlichem Medienaustausch.

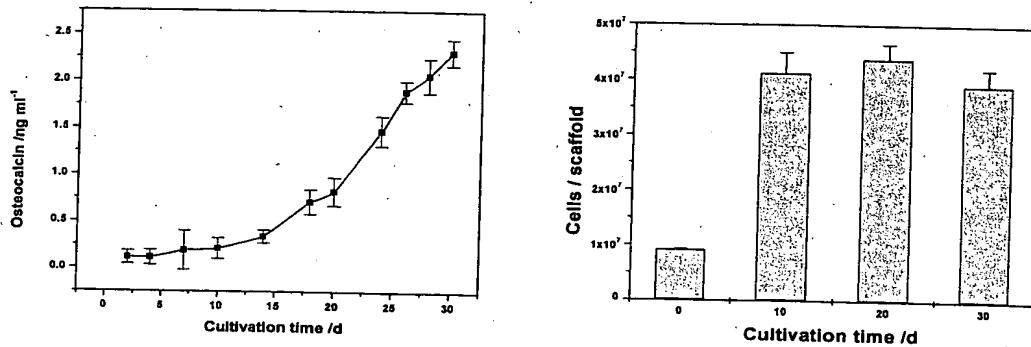


Fig. 2: Osteocalcin Konzentration im Überstand bestimmt mit ELISA und Gesamtzellzahl in den Scaffolds gemessen durch DNA-Fluoreszenzfärbung mit Hoechst 33258.

Wie die L-Lactat Produktionsrate zeigt, kommt es am Anfang zu einem schnellen Wachsen der Zellen und einer folgenden stationären Phase, die darauf hinweist, dass die Zellen die makroporöse Oberfläche der Gerüste komplett besiedelt haben und nun die Phase der Differenzierung erreicht haben. Dies wird bestätigt durch die Produktionsrate der löslichen alkalischen Phosphatase (Fig. 1) und letztlich durch die Produktion von Osteocalcin, das direkt mit der Mineralisation zusammenhängt (Fig. 2). Die Gesamtzellzahl ist auf das 4-fache der Anfangszellzahl angestiegen und bleibt nun während der verbleibenden Zeit konstant (Fig. 2), als Zeichen des Zusammenschließens auf dem Gerüstmaterial und Differenzierung in reife,

extrazelluläre Matrix bildende, nicht proliferierende Zellen. Das konstante Freisetzen von Lactat-Dehydrogenase (LDH) weist auf eine ständige Lysierung eines kleinen Teils an Zellen hin, der offensichtlich durch neue ersetzt wird. Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon bei 2-D Kulturen beobachtet. Der hohe LDH Wert am Anfang lässt sich zurückführen auf die noch nicht angehefteten Zellen während der ersten 12 Stunden, bevor die Gerüste in den Bio-Reaktor transferiert werden. Mit dem Starten der Perfusion werden diese Zellen aus den Gerüsten ausgeschwemmt und Lysis entläßt das Enzym (Fig. 1).

Zusammenfassend zeigt der Kultivierungsprozess die hohe Eignung für die dreidimensionale *in vitro* Vermehrung und spätere Differenzierung osteogener Zellen auf biokompatiblen und bioresorbierbaren Gerüst Materialien.

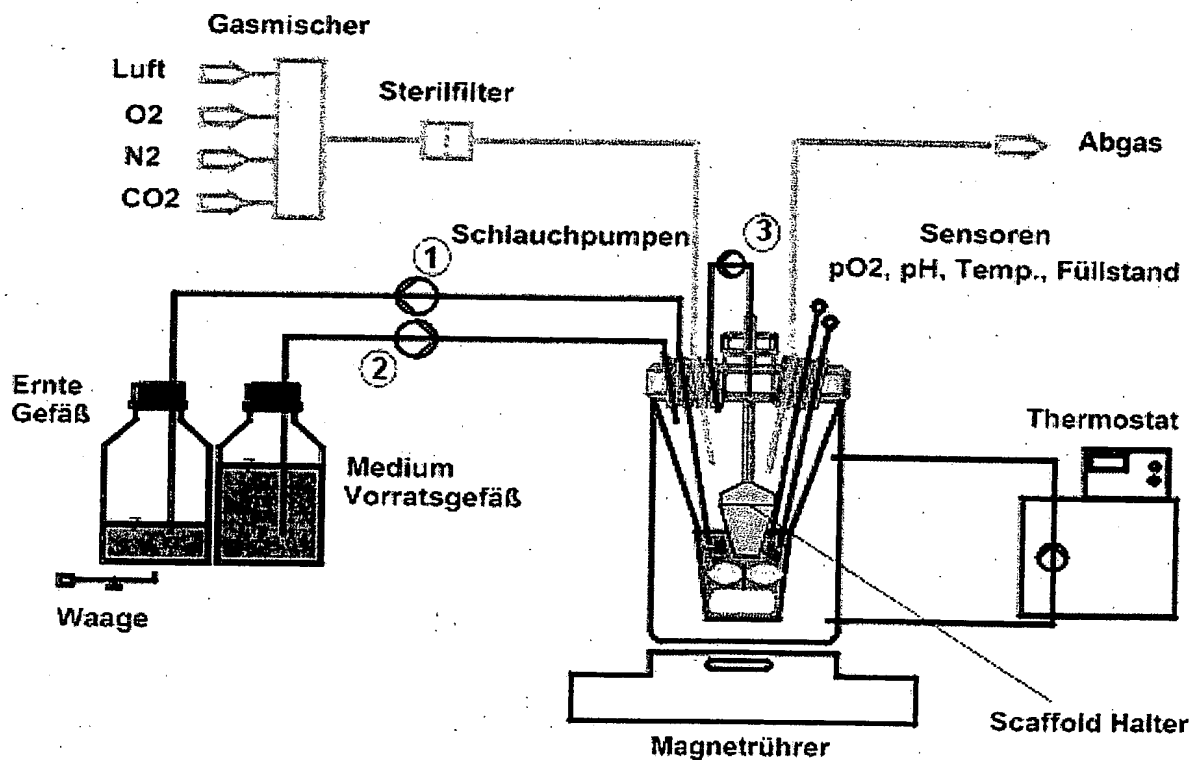


Fig. 3: Schematische Übersicht des Aufbaus eines Perfusionsreaktors mit kontinuierlichem Medienaustausch

In Fig. 3 ist der Aufbau eines Perfusionsreaktors mit kontinuierlichem Medienaustausch dargestellt. Die in dem Scaffold-Halter befindliche mit Zellen besiedelte Gerüststruktur wird über die regelbare Pumpe 3 kontinuierlich mit Medium durchströmt. Die Gasversorgung wird durch die regelbare Gasmischeinheit mit nachgeschaltetem Sterilfilter und Befeuchtung und die kontinuierliche Durchmischung mit dem Rührelement gewährleistet das gesamte System wird durch die

eingebraachten Sensoren für pO<sub>2</sub>, pH, Temp und Füllstand überwacht und geregelt. Über die regelbaren Schlauchpumpen 1 und 2 kann kontinuierlich geregelt Medium ausgetauscht werden. Eine unter dem Erntegefäß angebrachte Waage ermittelt dabei die Durchflußrate.

6. Patentansprüche
- 6.1 Verfahren zur Kultivierung von Gewebezellen auf dreidimensionalen Strukturen mit geregelter Zwangsdurchströmung.
- 6.2 Verfahren nach 6.1 bei dem das Medium im Kreislauf geführt wird.
- 6.3 Verfahren nach 6.1/6.2 bei dem das Medium kontinuierlich ausgetauscht wird.
- 6.4 Verfahren nach 6.1-6.3 bei dem als Gas Luft oder ein anderes zur Versorgung der Zellen dienendes Gas verwendet wird.
- 6.5 Verfahren nach 6.1-6.4 zur Gewinnung implantierbarer Knochenkonstrukte
- 6.6 Reaktionssystem zur Kultivierung von adhärennten Zellkulturen oder Geweben bei geringen Volumina (7,8), mit einem zylindrischen oder konischen mehrteiligen Halter für massive, poröse oder partikuläre Trägermaterialien mit variabler Formgebung mit der Möglichkeit der sequentiellen oder kontinuierlichen Durchströmung mit Nährmedium.
- 6.7 Halterrohr (6) mit sterilsicherer Klemmung (2) zur Höhenjustierung.
- 6.8 konisches Gefäß mit zylindrischer Anformung und Flachboden.
- 6.9 zylindrisches magnetgekuppeltes Rührelement (11) mit aufgesetztem Propellerrührer (10) variabler Größe und Form.

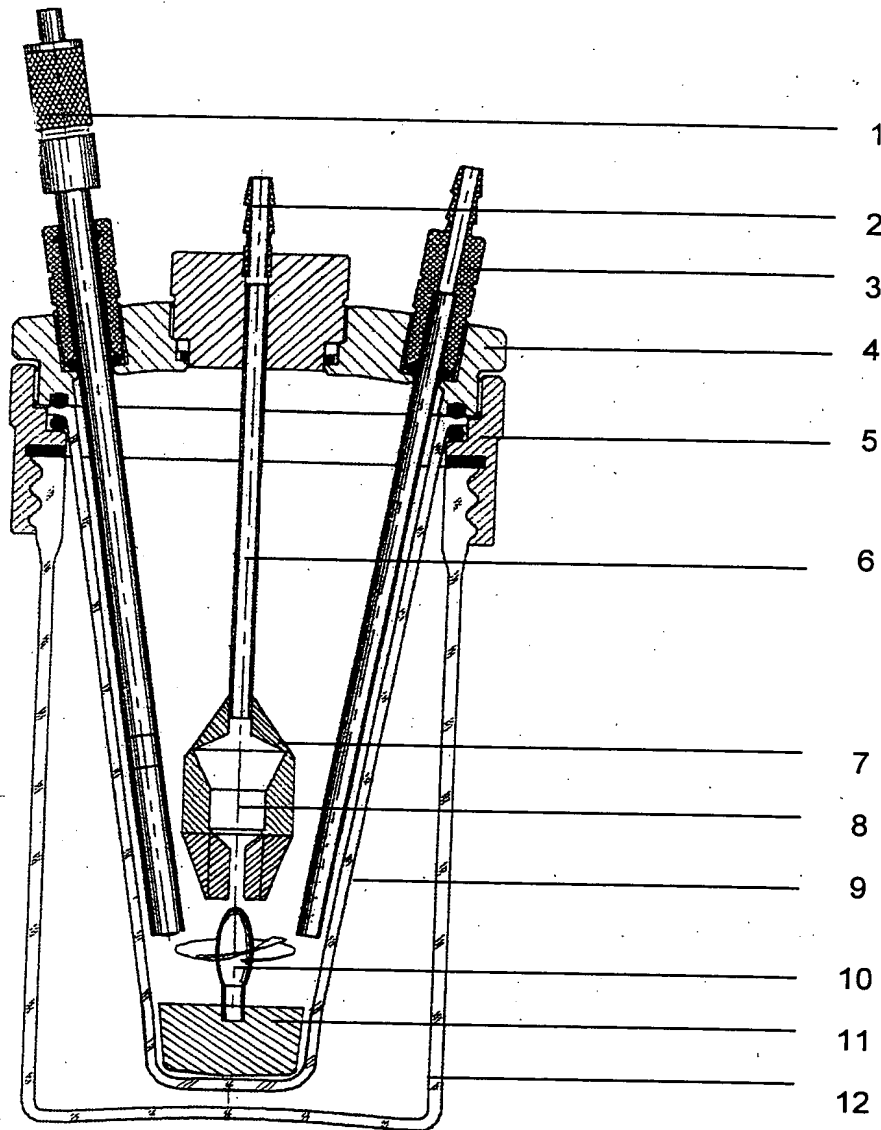


Fig. 4 Schnittzeichnung  
Reaktionssystem zur Kultivierung von adhärenenten Zellkulturen kleiner Volumina

Bezeichnungsliste:

- 1 Meßsonde
- 2 Klemmverschraubung und Zulauf für Zirkulationspumpe
- 3 Rücklauf Zirkulationspumpe
- 4 Deckel
- 5 Verbindungsring
- 6 Halterohr
- 7 Ablaufkonus
- 8 variabler Trägerhalter
- 9 konisches Gefäß mit zylindrischer Anformung für Rührelement
- 10 Propellerrührer
- 11 Magnetrührelement
- 12 zylindrisches Außengefäß

## Literatur:

Ishaug-Riley, S.L., Crane-Kruger, G.M., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G.: *Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers*. Biomater. **19**, 1405-1412, 1998.

Goldstein, A.S., Zhu, G., Morris, G.E., Meszlenyi, R.K., Mikos, A.G.: *Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foam scaffolds*. Tissue Eng. **5**, 421-434, 1999.

Shea, L.D., Wang, D., Francheschi, R.T., Mooney, D.J.: *Engineered Bone Development from a Pre-Osteoblast Cell Line on three-dimensional scaffolds*. Tissue eng. **6**, 605-616, 2000.

Davies, J.E., *Bone engineering*, em squ. inc., Toronto, 1999.

Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG.: *Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds*. Biomaterials **22**(11), 1279-88, 2001.

Minuth WW, Strehl R, Schumacher K, de Vries U.: *Long term culture of epithelia in a continuous fluid gradient for biomaterial testing and tissue engineering*. J Biomater Sci Polym Ed. **12**(3), 353-65, 2001.

Schumacher K, Strehl R, Minuth WW.: *Detection of glycosylated sites in embryonic rabbit kidney by lectin chemistry*, Histochem Cell Biol. **118**(1), 79-87, 2002.

Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR: *Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture*. Biomaterials. **15**(6), 451-6, 1994.

Ishaug-Riley, S.L., Crane-Kruger, G.M., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G.: *Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers*. Biomater. **19**, 1405-1412, 1998.

Goldstein, A.S., Zhu, G., Morris, G.E., Meszlenyi, R.K., Mikos, A.G.: *Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foam scaffolds*. Tissue Eng. **5**, 421-434, 1999.

Shea, L.D., Wang, D., Francheschi, R.T., Mooney, D.J.: *Engineered Bone Development from a Pre-Osteoblast Cell Line on three-dimensional scaffolds*. Tissue eng. **6**, 605-616, 2000.